

16

CAPÍTULO

Cinética enzimática

La función fundamental de las enzimas es aumentar la velocidad de las reacciones químicas que ocurren en los seres vivos. El comportamiento de esa velocidad y su modificación debido a la presencia de diferentes agentes físicos o químicos constituye el objeto de estudio de la cinética enzimática.

La característica más sobresaliente de estas reacciones es la participación de las enzimas, lo cual significa que su velocidad está influida no sólo por la concentración de sustrato y producto, sino además y principalmente por la presencia de una molécula proteínica que no será alterada por la reacción en que participa.

En la medida que la reacción progresa la concentración del sustrato va disminuyendo y la del producto aumenta, pero la concentración total de la enzima permanece invariable.

El objetivo final de la cinética enzimática es aprovechar los estudios de velocidad para esclarecer los diferentes mecanismos por los cuales las enzimas realizan su función y correlacionar éstos con la estructura tridimensional de la proteína enzimática.

En este capítulo se hará un estudio de las características principales de la velocidad de las reacciones en que intervienen las enzimas, así como de los diferentes factores que pueden modificarla.

Condiciones para los estudios cinéticos

Para el estudio de la velocidad de las reacciones catalizadas por una enzima y la interpretación adecuada de sus resultados se requieren algunas condiciones.

Teniendo en cuenta que son varios los factores que pueden modificar la velocidad de la reacción sólo puede estudiarse un factor a la vez, con cuidado de que todos los demás permanezcan constantes; sin embargo no pueden mantenerse constantes, la concentración del sustrato ni la del producto, pues su variación es el índice que asegura que la reacción está ocurriendo; para salvar esa dificultad se introdujo el concepto de velocidad inicial (v_0) que es la velocidad de la reacción cuando aún no se ha consumido el 10 % del sustrato inicial. Esto obliga a realizar primero algunos ensayos en diferentes tiempos de incubación, de forma tal que pueda fijarse el intervalo necesario para estar seguro de que en el estudio se miden velocidades iniciales.

Además, la medida de la velocidad inicial evita que las determinaciones estén influidas por otros factores como:

1. Si la reacción es reversible, la velocidad de la reacción inversa aumentará en la misma medida que la concentración del producto y descenderá la velocidad de transformación del sustrato.
2. Si no se proporciona sustrato en exceso su concentración descenderá con el tiempo, lo que provocaría una disminución progresiva de la velocidad.
3. El producto de la reacción puede inhibir la actividad de la enzima.

La velocidad de una reacción catalizada por una enzima, puede medirse por 2 tipos de procedimientos, utilizando una técnica discontinua (de muestreo) en la que se toman muestras de la mezcla de reacción en diferentes tiempos, se detiene la reacción y se analiza el contenido de sustrato o producto en las muestras. También puede aplicarse una técnica de observación continua en la que se hace uso de una propiedad física distintiva del sustrato o producto u otro participante de la reacción que se puede medir cuantitativamente sin interferir el desarrollo de la reacción, como puede ser el cambio que se produce en el espectro de absorción debido a la formación del producto. Este tipo de procedimiento es el más aconsejable, pero no siempre es factible.

La velocidad inicial debe medirse por la variación de la concentración del producto por unidad de tiempo, siempre que ello sea posible, pero en ocasiones no se dispone de los procedimientos necesariamente exactos y se hace midiendo la variación de la concentración del sustrato.

En la práctica los estudios cinéticos se realizan de la forma siguiente: en primer lugar se procede a determinar el tiempo de incubación como ya fue explicado, después se prepara un conjunto de tubos de ensayo donde se encuentran todos los componentes de la mezcla de reacción (*buffer*, sustrato, activadores, etcétera) menos la enzima; esta mezcla se coloca en baño de temperatura regulable, fijando ésta en un valor determinado, donde también se incuba por unos minutos la solución que contiene la enzima. Por último, se añade a cada tubo la solución de enzima; auxiliados de un cronómetro se mide el tiempo de reacción a partir del momento en que se añadió la enzima, al transcurrir el tiempo indicado se procede a detener la reacción para añadir algún agente desnaturante de proteínas, uno de los más empleados es el ácido tricloroacético (TCA), se procede entonces a determinar la concentración del producto (o del sustrato), se calcula la diferencia con la concentración inicial (que en el caso del producto es cero) y este resultado se divide entre el tiempo de incubación, con lo cual se obtiene el valor de la velocidad; después se construye una gráfica cartesiana donde se representa la velocidad inicial en el eje de las ordenadas y el factor que se ha variado en el eje de las abscisas, la curva que se obtiene es la variación de la velocidad en función de la variación del factor estudiado.

Los factores que pueden modificar la velocidad de la reacción son la concentración de la enzima, del sustrato, de los cofactores y de iones H^+ (expresadas como unidades de pH), así como la temperatura, la presencia de inhibidores y activadores. Se estudiará a continuación cada uno de ellos.

Efecto de la concentración de enzima

Si se procede de la forma indicada pero haciendo que cada uno de los tubos de ensayo contenga una concentración diferente (creciente) de enzima, al procesar los datos obtendremos una gráfica (Fig.16.1).

La obtención de una línea recta que pasa por el origen de las coordenadas indica que existe una relación de proporcionalidad directa entre la velocidad de la reacción y la concentración de la enzima, que puede expresarse por la ecuación

$$v = k[E]$$

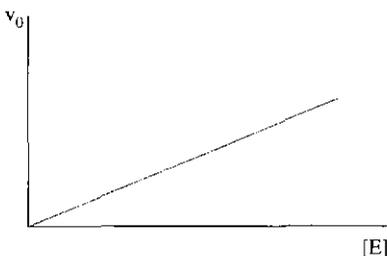


Fig. 16.1. Efecto de la concentración de enzima. La recta que se obtiene indica una relación de proporcionalidad directa entre la velocidad de la reacción y la concentración de la enzima, lo cual es el fundamento de toda la cinética enzimática.

lo que significa que la reacción es de primer orden con respecto a la concentración de enzima; esta relación constituye el fundamento de toda la cinética enzimática.

Este resultado era de esperar, si la concentración de sustrato está en exceso, a medida que se aumenta la concentración de la enzima se incrementa la formación del complejo ES y una vez formado éste se producirá la transformación del sustrato.

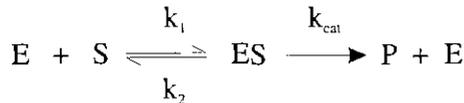
La actividad catalítica de las enzimas se expresa en unidades de enzima, y ésta es generalmente igual a la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 micromol de sustrato por minuto, bajo condiciones específicas. Cuando no se posee la enzima pura, sino una preparación impura, puede medirse en unidades por mL o su actividad específica en la preparación como unidades por mg de proteína total.

La relación de proporcionalidad directa entre la velocidad y la concentración de enzima permite la determinación de la concentración de alguna de ellas en los líquidos o tejidos corporales. Basado en este principio se determinan en el laboratorio clínico las concentraciones séricas de transaminasas, quininas, peptidasas, etcétera.

Efecto de la concentración de sustrato

En este caso la única diferencia entre los tubos de ensayo radica en que el sustrato está en cada uno de ellos en concentración diferente (Fig.16.2).

La primera explicación convincente para este comportamiento fue expuesta por *Leonor Michaelis* y *Maud Menten* en 1913, que según ellos la reacción se produce en 2 etapas: la unión de la enzima (E) con el sustrato (S) para formar un complejo enzima-sustrato (ES) de manera rápida, y la transformación del sustrato en producto (P) con la liberación de la enzima, que resulta la etapa más lenta



donde k_1 , k_2 y k_{cat} son las constantes de velocidad específica para cada etapa de la reacción. k_{cat} se conoce también como número de recambio de la enzima.

Como la segunda etapa es el paso limitante, la velocidad de la reacción depende de la descomposición del complejo ES según la ecuación:

$$v = k_{cat} [ES] \quad (1)$$

si se puede medir [ES] en diferentes momentos es factible calcular la velocidad, pero esto no siempre es posible, lo cual obliga a deducir una ecuación que permita calcular la velocidad en función de variables que se puedan medir.

Como la formación de ES es reversible y se descompone lentamente en producto, se establecerá un equilibrio entre E, S y ES cuando su velocidad de formación (v_f) sea igual a su velocidad de descomposición (v_d) y éstas vienen dadas por las conocidas ecuaciones de velocidad:

$$v_f = k_1[E][S] \quad (2)$$

$$v_d = k_2[ES] \quad (3)$$

cuando $v_f=v_d$ tendremos que:

$$k_1 [E][S] = k_2 [ES] \quad (4)$$

$$[E][S]/[ES] = k_2/k_1 \quad (5)$$

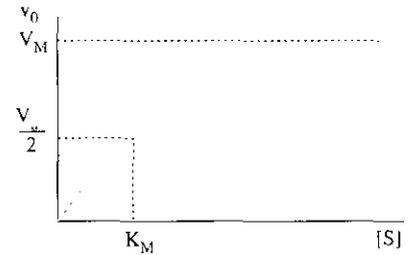


Fig. 16.2. Efecto de la concentración de sustrato. En la medida que la concentración de sustrato es mayor, la velocidad de la reacción es mayor, sin embargo, los incrementos en la velocidad no son uniformes, sino cada vez menores; cuando se alcanza un determinado valor de la concentración de sustrato, la velocidad se hace prácticamente constante, en ese momento la reacción ha alcanzado la V_M . La concentración de sustrato para la cual la velocidad de la reacción es igual a $V_M/2$ es la constante de Michaelis (K_M), que es un índice de la afinidad de la enzima por el sustrato.

el cociente de las 2 constantes, que es la constante de disociación del complejo ES recibe el nombre de constante de Michaelis (K_m).

La enzima libre (E) será igual a la enzima total (E_t) menos la que se encuentra en forma de ES. Si se introducen estas consideraciones en la ecuación (5), se tiene que:

$$[E_t - ES] [S] / [ES] = K_m$$

si se despeja $[ES]$

$$[ES] = [E_t][S] / (K_m + [S]), \quad (6)$$

sustituyendo $[ES]$ por su equivalente en (1) se obtiene:

$$V_0 = \frac{k_{cat} [E_t] [S]}{K_m + [S]}$$

En esta ecuación cabe considerar 3 casos:

1. Cuando $[S] \gg K_m$: en este caso el denominador $K_m + [S]$ es casi igual a $[S]$ y simplificando obtenemos:

$$v = k_{cat} [E_t]$$

Las concentraciones muy elevadas de sustrato producen un efecto de saturación, o sea, todos los centros activos de las enzimas han sido ocupados por el sustrato y casi toda la enzima se encuentra en forma de ES. Teniendo presente la ecuación (1) es posible inferir que en ese momento se habrá alcanzado la mayor velocidad posible para la reacción que se denomina velocidad máxima (V_m). En estos momentos la velocidad se hace independiente de la $[S]$, o sea, es de orden cero. Así se obtiene la forma habitual de la ecuación de Michaelis:

$$V_0 = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

2. Cuando $[S] \ll K_m$: en este caso el valor del denominador será prácticamente igual a K_m y la ecuación se transforma en

$$V_0 = \frac{V_m}{K_m} \cdot [S]$$

el cociente de las 2 constantes V_m/K_m es una constante y por lo tanto, la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración de sustrato o, dicho de otra forma, es de primer orden con respecto a la concentración de sustrato.

3. Cuando $[S] = K_m$: en este caso el denominador pasa a ser $2[S]$ que al simplificar nos queda:

$$v = V_m/2$$

esto significa que el valor de K_m es igual a la concentración de sustrato, cuando la velocidad inicial es igual a la mitad de la velocidad máxima; en este momento la mitad de las moléculas de la enzima está en estado libre y la otra en forma de ES.

Si la curva tiene siempre la misma forma la diferencia entre ellas estará dada por los valores de V_m y K_m , de ahí que éstos se conozcan como los parámetros cinéticos de la ecuación de Michaelis. Analicemos brevemente el significado de cada uno de ellos. La V_m se alcanza cuando las moléculas de sustrato han ocupado todos los sitios activos de todas las moléculas de la enzima, por lo que la velocidad de reacción en ese momento sólo depende de la capacidad que tenga la enzima para transformar el sustrato. A partir del valor de V_m se puede calcular el número de recambio de la enzima; si una solución 10^{-6} M de anhidrasa carbónica que cataliza la formación de $0,6$ M de H_2CO_3 por segundo cuando está completamente saturada de sustrato según la ecuación



podemos calcular k_{cat} , pues

$$V_m = k_{cat} [Et]$$

$$6 \times 10^{-1} = k_{cat} \times 10^{-6}$$

$$k_{cat} = 6 \times 10^{-1} / 10^{-6} = 6 \times 10^5$$

esto significa que la enzima produce 600 000 moléculas de H_2CO_3 por segundo y éste es precisamente el significado del número de recambio.

La K_m , como la hemos definido (otras definiciones pueden originar otros significados), es igual a la constante de disociación del complejo ES y por ello representa una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato, de forma que mientras mayor sea la afinidad menor será el valor de la K_m . En la tabla 16.1 se relacionan los valores de K_m y de k_{cat} de algunas enzimas.

Tabla 16.1. Valores de la K_m y la k_{cat} de algunas enzimas

Enzima	Sustrato	K_m (M)	k_{cat} (s^{-1})
Anhidrasa carbónica	CO_2	$1,2 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^6$
Acetilcolina esterasa	Acetilcolina	$9,5 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^4$
Catalasa	H_2O_2	$2,5 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^7$
Fumarasa	Fumarato	$5,0 \times 10^{-6}$	$8,0 \times 10^2$
Fumarasa	Malato	$2,5 \times 10^{-5}$	$9,0 \times 10^2$
Ureasa	Urea	$2,5 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^4$

Para determinar de manera experimental los valores de V_m y K_m resulta muy engorroso el empleo de la curva hiperbólica, pues sería muy difícil dibujarla ajustada si los puntos experimentales están muy dispersos, además resulta difícil conseguir concentraciones suficientemente elevadas de sustrato para alcanzar V_m , o casi impracticable medir las bajas velocidades iniciales con pequeñas concentraciones de sustrato. Todas estas dificultades se evitan con el método de determinación de Lineweaver y Burk, este procedimiento resulta de una transformación de la ecuación de Michaelis y consiste en tomar los inversos de ésta, representar el inverso de la velocidad inicial ($1/v_0$) en el eje de las ordenadas y el inverso de la concentración de sustrato ($1/[S]$) en el eje de las abscisas; la transformación de una ecuación a la otra es muy sencilla.

Al tomar los inversos en la ecuación de Michaelis se obtiene

$$\frac{1}{V_0} = \frac{[S] + K_m}{V_m [S]}$$

descomponiendo el sumando y simplificando se obtiene

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

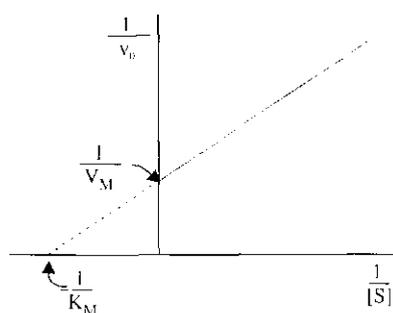


Fig. 16.3. Representación de Lineweaver Burk. En la gráfica, doblemente recíproca al plotear $1/v_0$ contra $1/[S]$, se obtiene una línea recta con interceptos de $1/V_m$ para las ordenadas y $-1/K_m$ para la abscisas, y permite la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis con más exactitud que la gráfica hiperbólica.

Obsérvese la homología con la ecuación general de una línea recta del tipo $y=ax+b$, cuya pendiente es K_m/V_m y con el intercepto igual a $1/V_m$ para las ordenadas y $-1/K_m$ para las abscisas (Fig. 16.3).

Esta línea recta, la gráfica doblemente recíproca, se debe preferir a la gráfica hiperbólica como método de determinación de V_m y K_m , ya que una línea recta puede dibujarse y extrapolarse de forma más rigurosa que cualquier curva. Este conocimiento es muy importante a la hora de analizar los inhibidores enzimáticos.

Reacciones con 2 sustratos

En muchas reacciones enzimáticas de importancia biológica se utilizan 2 sustratos (o un sustrato y una coenzima) para formar 2 productos, por lo cual la ecuación general sería



El mecanismo de estas reacciones es más complejo que aquéllas en que interviene un solo sustrato y sus ecuaciones cinéticas más difíciles de determinar.

El hecho más sobresaliente es el orden en que los sustratos se combinan con la enzima y el orden en que se liberan los productos. Atendiendo a este aspecto se han distinguido 3 mecanismos básicos de reacciones bisustrato.

Mecanismo ordenado. Los sustratos se enlazan y los productos se liberan en un orden obligado como se muestra a continuación:



donde EAB (complejo enzima-sustratos) y EPQ (complejo enzima-productos) se interconvierten rápidamente (Fig. 16.4).

El ejemplo más abundante son las deshidrogenasas que funcionan con NAD^+ como coenzima aceptora de hidrógenos, en las cuales la enzima se une primero a la

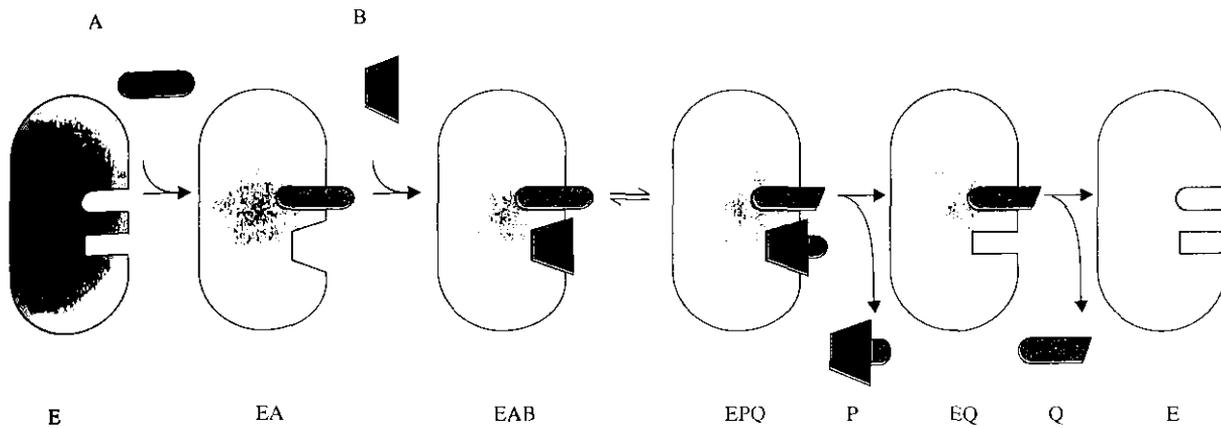
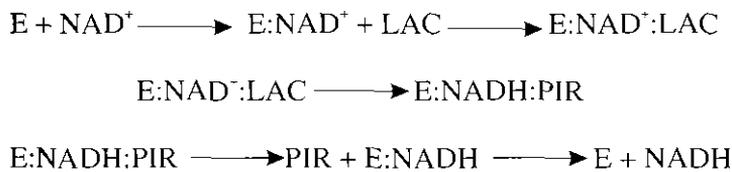


Fig. 16.4. Mecanismo ordenado con 2 sustratos. La enzima (E) debe unirse primero con el sustrato A y formar el complejo EA, pues el sitio de unión de B no es accesible a su sustrato. La unión de B da lugar a la formación del complejo ternario EAB que se transforma lentamente en el complejo enzima-productos (EPQ), que después libera también sus productos de forma ordenada.

coenzima y con posterioridad al sustrato, liberan primero el producto oxidado y después la coenzima reducida.



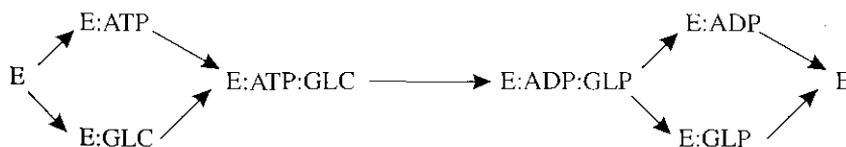
Esta reacción está catalizada por la enzima lactato-deshidrogenasa que oxida el lactato (LAC) en piruvato (PIR) con la reducción simultánea del NAD^+ a NADH.

Este mecanismo desde el punto de vista estructural se fundamenta en que el centro activo no está totalmente formado en ausencia de los sustratos y la unión del primero de ellos produce un cambio conformacional en la enzima que casi crea el sitio de reconocimiento para el segundo, de esta manera el orden de unión de los sustratos es obligado.

Mecanismo de orden azaroso. Los sustratos pueden unirse a la enzima en cualquier orden, lo que hace suponer que existe un sitio de unión diferente para cada uno de ellos (Fig. 16.5).



Un ejemplo típico de estas enzimas son las quinazas, que en el caso de la hexoquinasa sería:



En esta reacción la enzima transfiere un grupo fosfato del ATP a la glucosa (GLC) para formar glucosa-6-fosfato (GLP) y ADP. Como se muestra, la enzima puede unir primero a la glucosa o al ATP y liberar la glucosa-6-fosfato antes o después que el ADP.

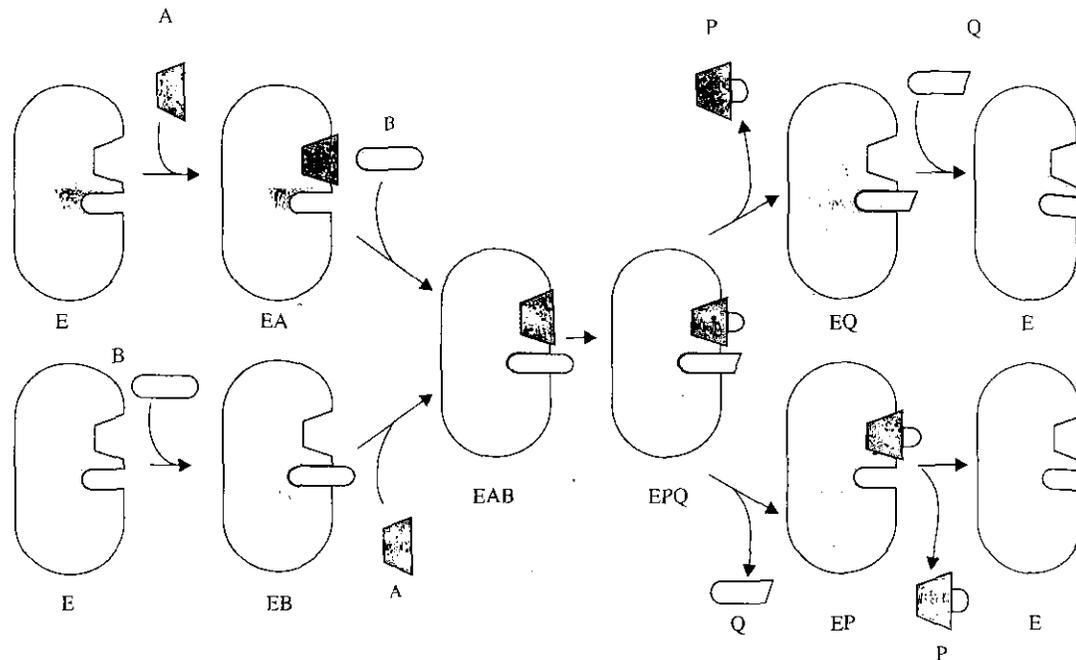
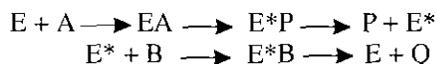


Fig. 16.5. Mecanismo de orden aleatorio con 2 sustratos. La enzima (E) presenta sus 2 centros activos accesibles a sus respectivos sustratos A y B, por eso cualquiera de ellos puede unirse primero para formar los complejos EA ó EB; a estos complejos se une el otro sustrato y se forma el complejo ternario EAB, que se transforma en el complejo enzima-productos EPQ que puede liberar sus productos en cualquier orden.

Mecanismo ping pong. Se caracteriza porque un producto se forma y libera antes de la incorporación del segundo sustrato; esto puede explicarse por la existencia de una enzima en 2 formas (E y E*), una capaz de unir al primer sustrato y la otra al segundo. El paso de la enzima de una forma a otra de manera constante fue lo que quiso denotar Cleland cuando denominó *ping pong* a este mecanismo.



Este mecanismo se ilustra en la figura 16.6.

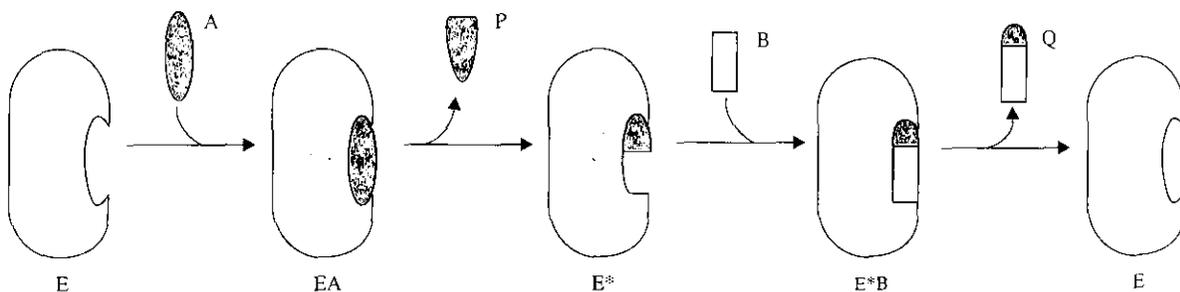
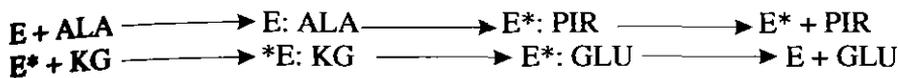


Fig. 16.6. Mecanismo *ping pong*. La enzima (E) sólo puede unirse al sustrato A formando el complejo EA que libera el producto P y deja modificada la enzima (E*), sólo entonces puede unirse al segundo sustrato B y formar el complejo E*B que libera el producto Q quedando la enzima en su forma inicial para comenzar un nuevo ciclo catalítico.

El ejemplo más característico es el de las transaminasas (enzimas que transfieren grupos amino), en el caso de la transaminasa glutámico-pirúvico tendremos



En esta reacción la enzima se une primero a la alanina (ALA) formando el complejo transaminasa-alanina (E:ALA), que al convertir la alanina en pirúvico (PIR) deja modificada también a la enzima (E*), esta forma E* puede unirse al ácido α -ceto-glutámico (KG) que al transformarse en glutámico (GLU) regenera la forma original de la transaminasa. La deducción de las ecuaciones de velocidad para cada uno de estos tipos de reacciones va más allá del alcance de este texto.

Efecto de la concentración de cofactores

La concentración de cofactores suele tener un efecto similar a la concentración de sustrato.

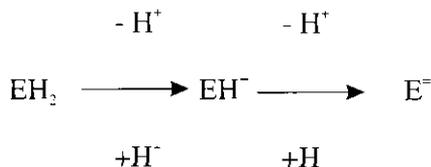
La coincidencia de las 2 gráficas es un hecho experimental importante para afirmar que los cofactores se unen a la enzima por un sitio específico y en una relación estequiométrica que explica el fenómeno de saturación observado; este sitio pudiera ser el centro activo.

Efecto del pH

Si realizamos una experiencia como la descrita pero haciendo que la mezcla de incubación contenga soluciones *buffer* de diferentes valores de pH, se obtendrá una gráfica como la que se muestra en la figura 16.7.

Como se observa, la curva tiene una forma acampanada con una zona central estrecha que se corresponde con los mayores valores de la velocidad; al valor de pH donde se obtiene la mayor velocidad se le denomina pH óptimo. Esta gráfica se explica teniendo en cuenta que el pH modifica el estado de disociación de los grupos químicos presentes en la enzima o en el complejo enzima-sustrato, con lo que puede modificarse unas veces la unión y otras la transformación. En valores extremos de pH (cerca de 0 ó 14) puede producirse desnaturalización de la proteína enzimática, lo que contribuye a la poca actividad observada en esta zona.

El pH óptimo es un valor característico para cada enzima y expresa que en ese valor la enzima se encuentra en su conformación más activa. Supongamos que los grupos que forman el centro activo puedan existir en 3 estados de disociación dependientes del pH,



si el estado más activo es EH^- obtendremos la curva descrita que es la de la mayoría de las enzimas; si fuera EH_2 la curva carecería de la rama ascendente, como sucede con la pepsina; si fuera E^- carecería de la descendente, como sucede con la tripsina; estas 3 situaciones se representan en la figura 16.8.

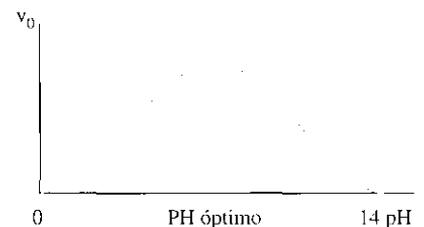


Fig. 16.7. Efecto del pH. Se obtiene una figura en forma acampanada donde se puede determinar la zona de pH óptimo. Obsérvese que la disminución o aumento del pH en relación con el pH óptimo provoca una disminución de la velocidad de la reacción.

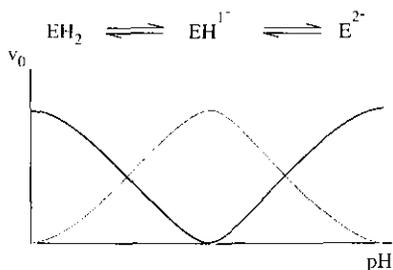


Figura 16.8. Diferencias en el pH óptimo. Dependiendo de la forma iónica donde la enzima tiene su mayor actividad se pueden obtener curvas diferentes que reflejan que cada enzima tiene un pH óptimo característico, esto se debe a la presencia en el centro activo de la enzima de grupos químicos que tienen diferente reacción ante los cambios de pH.

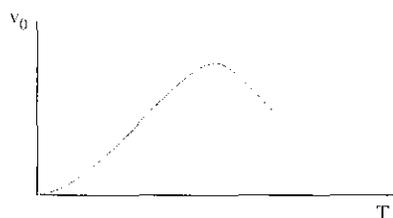


Fig. 16.9. Efecto de la temperatura. La velocidad de la reacción aumenta con la temperatura, pues ésta es un reflejo del aumento de la energía cinética de los componentes de la reacción, lo cual favorece los choques intermoleculares; después de ese incremento de velocidad al aumentar la temperatura, se producen alteraciones en la estructura tridimensional de la proteína enzimática que determinan una disminución en la velocidad de reacción.

Efecto de la temperatura

Un experimento semejante a los descritos, pero esta vez con los tubos de ensayo bajo temperaturas diferentes, muestra sus resultados en la figura 16.9.

La influencia de la temperatura sobre la velocidad de la reacción es un problema complejo en el cual intervienen varios factores, entre ellos el aumento de la energía del sistema al aumentar la temperatura, lo cual hace que los reactantes posean una energía cinética mayor y por tanto estén más próximos al estado activado, además, los efectos desestabilizantes de la temperatura sobre la estructura tridimensional de la proteína enzimática son imprescindibles para su acción.

Teniendo en cuenta al menos estos 2 factores puede resumirse el comportamiento de la velocidad en función de la temperatura como sigue.

El aumento de la temperatura refleja un aumento de la energía cinética de las moléculas, lo cual favorece la colisión entre las moléculas de enzima y sustrato, mientras mayor sea la temperatura mayor es el número de choques y mayor la velocidad de la reacción; pero a partir de un valor de temperatura comienza la desnaturalización de la proteína enzimática y con ello la pérdida de la actividad que se observa en los valores elevados de temperatura.

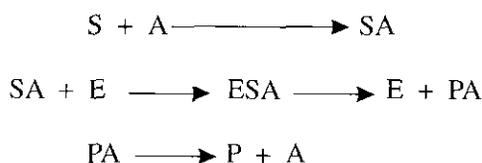
Efecto de los activadores

Como activadores enzimáticos se definen a las pequeñas moléculas, generalmente iones inorgánicos, que son requeridos, o al menos estimulan, la actividad catalítica de una enzima, y al contrario de los cofactores, no son participantes explícitos de la reacción. Aun cuando pueden plantearse diferentes formas de actuar, nos limitaremos a los 2 casos mejor conocidos: la interacción obligatoria con la enzima libre y la interacción obligatoria con el sustrato libre. En el primer caso se encuentran muchas enzimas que poseen iones metálicos en su centro activo como la carboxipeptidasa que contiene Zn^{2+} ; otras enzimas parecen requerir la presencia de un ion para estabilizar su conformación de máxima actividad catalítica.

La reacción general puede ser descrita de la forma siguiente:



En el segundo caso se encuentran enzimas que catalizan reacciones en las cuales intervienen nucleósidos di y trifosfatados, que requieren de la participación simultánea de un catión divalente (especialmente Mg^{2+}) en cantidades estequiométricas. Las investigaciones sobre estas reacciones han mostrado que un mecanismo probable para esta activación es la combinación del ion con el sustrato previo a su interacción con la enzima. El verdadero sustrato de la reacción sería el complejo sustrato-catión, el esquema de reacción sería:



La deducción de las ecuaciones cinéticas para estos casos rebasa los marcos de este texto.

Efecto de los inhibidores

Los inhibidores enzimáticos son sustancias que tienen en común la propiedad de disminuir la velocidad de las reacciones catalizadas por las enzimas. Casi siempre se distinguen 2 tipos generales de inhibición, la reversible y la irreversible, en el primer caso el inhibidor forma con la enzima un complejo enzima-inhibidor (EI) unido por fuerzas no covalentes y que por tanto puede disociarse; en el segundo, se producen modificaciones covalentes de la enzima que no pueden eliminarse fácilmente. En este capítulo sólo se tratará de los primeros.

Para estudiar el efecto y tipo de los inhibidores se realiza una experiencia igual a la determinación del efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad, pero ahora en cada uno de los tubos de ensayo se ha añadido un inhibidor en una concentración fija. Como en los casos anteriores los resultados se llevan a una gráfica y de acuerdo con ésta se clasifican los inhibidores; sólo se estudiarán los casos más típicos.

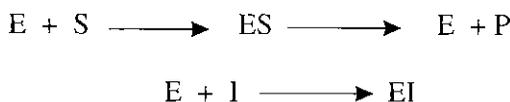
Inhibición competitiva

En la figura 16.10 se presenta una gráfica en la que aparecen también los resultados obtenidos sin el inhibidor.

La gráfica nos indica que para casi todas las concentraciones de sustrato utilizadas la velocidad de la reacción siempre es menor en presencia del inhibidor, sólo en concentraciones muy elevadas del sustrato se logra superar la inhibición y eso hace que la V_m sea igual en ambos casos; esto implica que se modifique el intercepto del eje de las abscisas que como sabemos es una función de la K_m .

Si la K_m está aumentada y la V_m está sin modificación, se dice que el inhibidor es de tipo competitivo. El hecho de que la V_m no se altere significa que la capacidad catalítica de la enzima es la misma con inhibidor o sin él. El aumento de K_m indica que existe una disminución de la afinidad de la enzima por el sustrato; estos hechos son compatibles si suponemos que el inhibidor es capaz de unirse al centro activo para impedir la entrada del sustrato; si el sustrato no entra al centro activo no puede ser transformado por la enzima y esto explica la disminución de la velocidad, o sea, se establece una competencia entre el sustrato y el inhibidor por ocupar el centro activo de la enzima. Cuando las concentraciones de sustrato son elevadísimas la probabilidad de unión enzima-sustrato es muy alta y por ello se alcanza la velocidad máxima de la reacción.

El esquema de la reacción en presencia de un inhibidor competitivo sería:



y para ello se definen 2 constantes de disociación, la K_m que ya conocemos y la K_i para la disociación del complejo EI y resulta

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

el valor aparente de K_m^* que se obtiene con el inhibidor, se relaciona con la K_m si el inhibidor por la ecuación

$$K_m^* = K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

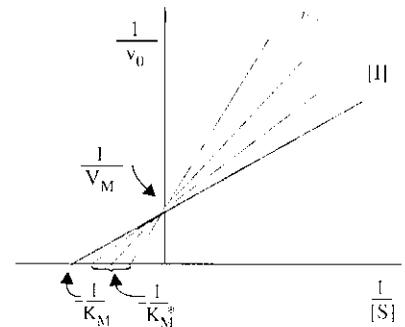
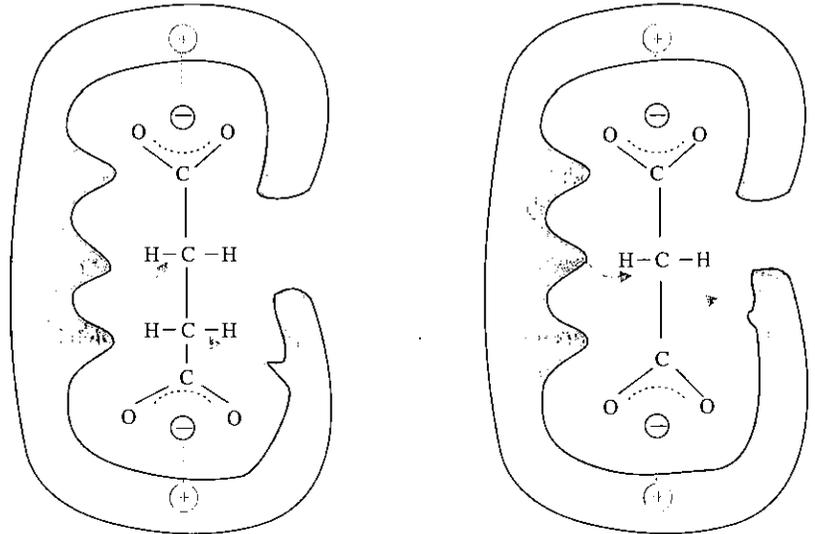


Fig. 16.10. Inhibidores competitivos. Los inhibidores competitivos ocupan el centro activo de la enzima que se hace inaccesible al sustrato. El aumento de la concentración de sustrato puede hacer que éste desplace al inhibidor y cuando su concentración sea muy elevada impedir la entrada del inhibidor, es por eso que la presencia de un inhibidor competitivo determina una variación en el valor de la K_m sin alterar el valor de V_m ; variando la concentración del inhibidor se obtiene una familia de curvas que se cortan en el eje de las ordenadas justo en el punto $1/V_m$.

Nótese que parte de la enzima se encuentra en forma de complejo EI que no da producto, pues no puede unir al sustrato, lo que significa que existe una disminución del número de centros activos útiles y, por tanto, una menor velocidad de la reacción.

Una característica de los inhibidores competitivos es que su estructura es semejante a la del sustrato. En la figura 16.11 se muestra cómo la succinato deshidrogenasa puede ser inhibida de forma competitiva por el malonato, cuya estructura es muy similar a la del succinato, que es el sustrato natural de la enzima.

Fig. 16.11. Mecanismo de la inhibición competitiva. La similitud estructural del inhibidor con el sustrato hace que aquél pueda unirse al centro activo, pero sus diferencias le impiden la transformación. La enzima succinato-deshidrogenasa une al ácido succínico y actúa sobre los hidrógenos colocados en carbonos adyacentes. Cuando el ácido malónico, que tiene una estructura similar, se une al centro activo de la enzima produce una inhibición, pues no puede ser transformado, quedando unido al centro activo y, por tanto, impide la entrada y transformación del sustrato verdadero.



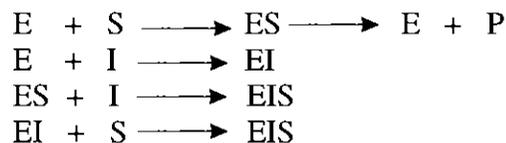
Inhibición no competitiva

En la figura 16.12 al igual que en el caso anterior se muestran además los resultados del experimento sin el inhibidor.

Los efectos de este inhibidor sobre los parámetros cinéticos son contrarios al anterior, se observa una disminución de la V_m sin alteraciones de la K_m ; ni siquiera en concentraciones elevadísimas de sustrato se logra eliminar la inhibición.

Si la K_m no se ha modificado quiere decir que no existe impedimento para la unión de la enzima con el sustrato, pero la afectación de la V_m indica que el inhibidor disminuye de alguna forma la capacidad catalítica de la enzima. Se acepta que la unión enzima-inhibidor se produce en un sitio diferente del centro activo y que esa unión modifica las propiedades catalíticas de la enzima, posiblemente modificando la conformación del centro activo de forma que no impide la unión del sustrato pero dificulta grandemente su transformación.

El esquema de la reacción con la participación de un inhibidor no competitivo será



La enzima existe en un estado libre y en forma de varios complejos (EI, ES y EIS) de los cuales sólo ES da productos. Si suponemos que la unión de S a la enzima no

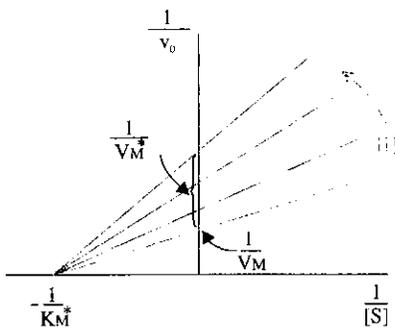


Fig. 16.12. Inhibidores no competitivos. El inhibidor no competitivo no se aloja en el centro activo y no puede impedir la entrada del sustrato, pero de alguna forma dificulta su transformación; en su presencia las curvas que se obtienen difieren en el valor de $1/V_m$, pero no alteran el valor de $-1/K_m$. Variaciones en la concentración del inhibidor dan origen a una familia de curvas que se cortan en el eje de las abscisas en el punto $-1/K_m$.

influye sobre la unión de I y viceversa, entonces la constante de disociación de EI será igual a la de EIS y viene dada por cualquiera de las ecuaciones siguientes:

$$K_i = [E][I]/[EI]$$

$$K_i = [ES][I]/[EIS]$$

El valor aparente de V_m^* que se obtiene en presencia del inhibidor se relaciona con la V_m de la reacción sin el inhibidor por la ecuación

$$V_m^* = V_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

En este caso también la enzima existe en forma de varios complejos de los cuales sólo ES puede dar productos, pero no existe ningún impedimento para la unión con el sustrato; la existencia de esos complejos determina una disminución del número de centros activos útiles en la preparación y, por tanto, una disminución de la velocidad de reacción.

Los inhibidores no competitivos no son análogos estructurales del sustrato; el iodoacetato es un potente inhibidor no competitivo de las enzimas que poseen grupos sulfhidrilos en, o cerca de, su centro activo.

Algunos medicamentos utilizados diariamente en la práctica médica son inhibidores enzimáticos, como el caso de las sulfamidas que se emplea en el tratamiento de infecciones bacterianas.

En general las armas químicas suelen ser también inhibidores enzimáticos que al bloquear determinadas reacciones pueden dañar un órgano o tejido específico, si la enzima que resulta inhibida está presente sólo en él, o al organismo en su totalidad si la enzima inhibida está muy distribuida en la economía.

La lucha contra la producción, almacenamiento y utilización de las armas químicas debe constituir una posición de principio de todo científico, pues es parte del comportamiento ético impedir el uso de los avances de la ciencia en perjuicio de la humanidad.

Resumen

La cinética enzimática es la parte de la enzimología que se ocupa del estudio de la velocidad de las reacciones enzimáticas y de los factores que la modifican.

En los estudios cinéticos se deben observar algunas reglas que permitan hacer una interpretación adecuada de los resultados, como son medir siempre velocidades iniciales y variar en cada experimento sólo uno de los factores que pueden alterar la velocidad. Los principales factores que influyen sobre la velocidad de la reacción son las concentraciones de enzimas, sustratos y cofactores, la temperatura, el pH y la presencia de activadores o inhibidores.

La velocidad de las reacciones enzimáticas es directamente proporcional a la concentración de enzima, lo cual constituye el fundamento de toda la cinética enzimática. La concentración de sustrato influye sobre la velocidad de forma muy característica. A medida que la concentración de sustrato aumenta se produce un aumento de la velocidad, pero en concentraciones muy elevadas de sustrato se produce un estado de saturación de la enzima que no permite mayores incrementos de velocidad. Para explicar este comportamiento se emplea la teoría de Michaelis-Menten, según la cual bastan 2 parámetros para explicarlo, uno, la K_m define la

afinidad de la enzima por el sustrato y el otro, V_m es un indicador de la capacidad catalítica de la enzima.

Cuando en la reacción intervienen 2 sustratos, uno de los aspectos más importantes que se debe determinar es el orden en que se ligan los sustratos y se liberan los productos. Atendiendo a este punto de vista se describen los mecanismos ordenados, los azarosos y el ping pong.

La influencia de la concentración de los cofactores es similar a la del sustrato.

La velocidad varía con el pH y existe una zona de pH óptimo donde la velocidad es la mayor. Variaciones del pH en ambos lados de esta zona determinan una disminución de la velocidad.

Al aumentar la temperatura la velocidad de reacción aumenta, pero pasado un límite comienza a disminuir, pues se producen alteraciones de la estructura tridimensional de la enzima.

Los activadores producen un aumento de la velocidad de la reacción, se distinguen 2 tipos principales, aquéllos que se unen a la enzima libre y los que se unen al sustrato. Por su parte los inhibidores disminuyen la velocidad de la reacción, bien porque modifican la K_m , en cuyo caso son de tipo competitivo, o por alteraciones de la V_m , que reciben el nombre de no competitivos.

Los estudios cinéticos son importantes para el conocimiento del mecanismo de acción de las enzimas, con el propósito de conocerlo y modificarlo. Muchos medicamentos y algunas armas químicas suelen ser inhibidores enzimáticos específicos.

Ejercicios

1. ¿Cuáles son las razones por las que en los estudios cinéticos debe siempre medirse velocidades iniciales?
2. En una experiencia cinética se observa que al aumentar la concentración de enzima no se produce el esperado aumento proporcional de la velocidad. ¿A qué factores pueden deberse estos resultados?
3. Si 2 enzimas actúan sobre el mismo sustrato con K_m de 4×10^{-4} y 7×10^{-6} , respectivamente ¿Qué conclusiones pueden derivarse de estos valores?
4. Calcule el número de recambio de una enzima que al estar en una concentración de 10^{-4} M forma 3×10^{-2} M del producto en un segundo.
5. Una enzima cataliza la reacción:



en un experimento realizado a pH=8 y a 30 °C se obtienen los datos siguientes:

[ala]mM	V_o ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ min}^{-1}$)
4	2,50
3	2,24
2,25	1,95
1,50	1,55

Calcule la K_m para la reacción

6. En el estudio de la reacción:



se encontró que el β -hidroxi-aspártico era un inhibidor de la enzima. Al tratar de determinar qué tipo de inhibidor era se obtuvieron los datos siguientes:

[L-aspártico] mmol l ⁻¹	v _o (mmol de CO ₂ min ⁻¹) (mg de proteína) ⁻¹	
	<i>sin inhibidor</i>	<i>con inhibidor</i>
25	17	-
33,3	21,3	5,7
50	27,8	8,1
100	41,7	14,7
200	52,6	25,0

Construya una gráfica de $1/v_o$ vs $1/[S]$ y determine de qué tipo de inhibidor se trata.